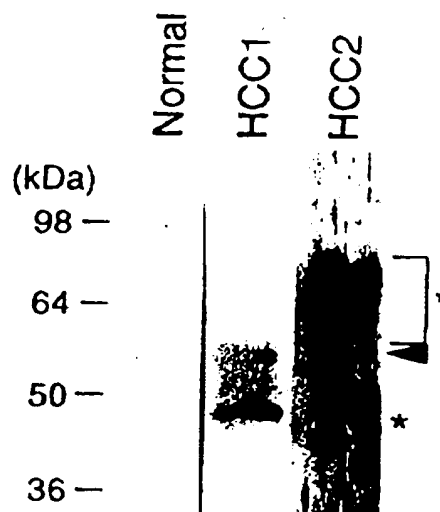




(51) 国際特許分類6 G01N 33/574, 33/53	A1	(11) 国際公開番号 WO97/27485  (43) 国際公開日 1997年7月31日(31.07.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00174  (22) 国際出願日 1997年1月27日(27.01.97)  (30) 優先権データ 特願平8/11695 1996年1月26日(26.01.96) JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友電気工業株式会社 (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 岸本利彦(KISHIMOTO, Toshihiko)[JP/JP] 〒244 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電気工業株式会社 横浜製作所内 Kanagawa, (JP) 田村隆明(TAMURA, Taka-aki)[JP/JP] 牧野泰孝(MAKINO, Yasutaka)[JP/JP] 〒263 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 千葉大学 理学部 生物学科内 Chiba, (JP)		(74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)  (81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。
(54)Title: <b>METHOD FOR DETECTING ANTI-GADII ANTIBODY AND METHOD FOR DIAGNOSING CANCER USING SAID DETECTION METHOD</b>  (54)発明の名称 抗GADII抗体の検出方法、及び該検出方法を用いた癌の診断方法  (57) Abstract A method for detecting an anti-GADII antibody and a method for diagnosing cancer using the detection method, more specifically, a method for diagnosing cancer by detecting an anti-GADII antibody present in the serum. A GADII protein increases with the onset of liver cancer and so does an antibody against the GADII protein. Thus, the onset of the cancer can be monitored by detecting the anti-GADII antibody.		

A



(57) 要約

本発明は、抗GAD I I 抗体の検出方法、及び該検出方法を用いた癌の診断方法に関し、特に、血清中に存在する抗GAD I I 抗体を検出することにより癌を診断する方法に関する。GAD I I 蛋白質は肝癌の発症に伴い増加し、また、GAD I I 蛋白質に対する抗体も肝癌の発症に伴い増加する。その結果、抗GAD I I 抗体を検出することにより癌発症のモニターが可能である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア共和国
BB	バルバドス	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア
BE	ベルギー	GH	ガーナ	MD	モルドバ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	GU	グアム	MK	マケドニア	TD	チャド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	TG	トーゴ
BS	バハマ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CC	中東	JP	日本	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CG	コンゴ	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KR	韓国	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボワール	KG	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	LI	リビア	PT	ポルトガル	VN	ベトナム
CO	コロンビア			RO	ルーマニア	YU	ユーゴスラビア
DE	ドイツ						
DK	デンマーク						

## 明細書

## 抗GAD I I抗体の検出方法、及び該検出方法を用いた癌の診断方法

## 技術分野

本発明は、抗GAD I I抗体の検出方法、及び該検出方法を用いた癌の診断方法に関し、特に、血清中に存在する抗GAD I I抗体を検出することにより癌を診断する方法に関する。

## 背景技術

癌の発症は遺伝子の何らかの異常によって起こることが知られており、特に、遺伝子の転写レベルでの変動異常が癌の発症の主たる原因と考えられている（『Science』Vol. 222、1983年、pp 765～771）。癌の発症機構の解明のため、発癌過程で発現状態が変化する蛋白質およびそれをコードする遺伝子、または、組織間で発現状態が変化する蛋白質およびそれをコードする遺伝子の取得は1980年頃よりさかんに行われてきた。例えば、癌組織を生化学的に分析し正常組織との違いを探し出すことで取得された癌特異的な蛋白質として $\alpha$ -フェトプロテインやCEA（がん胎児性抗原）の存在が知られている。

しかしながら、発癌機構はまだ一部しか解明されておらず、更なる発癌関連遺伝子及び蛋白質の解明が望まれている。また、それらの発癌関連遺伝子及び蛋白質を用いた新たな癌診断方法が望まれている。

## 発明の開示

本発明者らは、発癌過程で発現が増加する新規な蛋白質及び該蛋白質をコードする新規な遺伝子を単離、解明する目的で、サブトラクション法を用いてラット

肝癌に特異的に発現している遺伝子を抽出し、ドットスクリーニング法を用いた解析により肝癌で発現が増加する遺伝子を単離した。そして、肝癌 cDNA ライブラリーから該遺伝子の完全長の cDNA を得て、該遺伝子の塩基配列を決定した。さらに、該遺伝子がコードするアミノ酸配列を決定した。

また、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法により該 cDNA が肝癌特異的な遺伝子であることを確認した。本発明者らは、このようにして、肝癌に特異的な新規な遺伝子であるラット及びヒトの GAD I I 遺伝子を単離した。本発明者らはまた、ラットの GAD I I 蛋白質を大腸菌にて産生し、該蛋白質が由来する種以外のヒトを除く哺乳動物に免疫し、該蛋白質に対する抗体を作製し、該蛋白質の抗原性を確認した。

本発明は、上記の癌特異的蛋白質に対する抗体の検出方法及び該検出方法を用いた癌の診断方法を提供するものである。

本発明者らは、本発明者らが既に発明した癌特異的蛋白質である GAD I I 蛋白質に対する抗体が、発癌に伴い生体内に顕著に検出されることを見だし本発明を完成した。

本発明は、癌、特に肝癌において顕著に発現されている蛋白質である GAD I I を用いてそれに対する抗体を検出することにより、簡便に癌の発症をスクリーニングする方法を提供するものである。

#### 図面の簡単な説明

図 1 A は、正常ラットの血清と肝癌ラットの血清をそれぞれ組み換え GAD I I 蛋白質と反応させたウエスタンブロットの結果を表す写真である。図中の矢印は、GAD I I 蛋白質の位置を示す。

図 1 B は、正常ラットからの血清を希釈した試料及び肝癌ラットからの血清を希釈した試料をそれぞれ組み換え GAD I I 蛋白質と反応させたウエスタンブロットの結果を表す写真である。図中の数値は希釈倍率を示し、図中の矢印は、G

AD I I 蛋白質の位置を示す。

図 1 C は、正常ラットからの血清を希釈した試料及び DEN 投与後 1、3、5 及び 7 カ月経過後の肝癌ラットからの血清を希釈した試料をそれぞれ組み換え GAD I I 蛋白質と反応させたウエスタンブロットの結果を表す図である。図中の矢印は、GAD I I 蛋白質の位置を示す。

図 2 は、正常ラット及び肝癌ラットからの血清の希釈液をそれぞれ GAD I I 蛋白質と反応させたウエスタンブロットの結果を表す図である。

図 3 は、実施例 3 において行った、正常肝臓及び肝癌の mRNA について、GAD I I 遺伝子をプローブとしてノーザンブロットハイブリダイゼーション解析を行った結果を表す図である。レーン 1 は、正常肝臓の mRNA のレーン、レーン 2 は、DEN 投与 12 時間後の肝臓の mRNA のレーン、レーン 3 は、DEN 投与 24 時間後の肝臓の mRNA のレーン、レーン 4 は、DEN 投与 48 時間後の肝臓の mRNA のレーン、レーン 5 は、DEN 投与 1 カ月後の肝癌の mRNA のレーン、レーン 6 は、DEN 投与 3 カ月後の肝癌の mRNA のレーン、レーン 7 は、DEN 投与 5 カ月後の肝癌の mRNA のレーン、レーン 8 は、DEN 投与 7 カ月後の肝癌の mRNA のレーンであり、矢印 9 は、GAD I I mRNA のバンドの位置を表している。

図 4 は、実施例で用いた、GAD I I 遺伝子を導入するために使用したヒスチジンタグを導入した pET3a ベクターを示す図である。

図 5 は、GAD I I 遺伝子の各臓器での発現を表す図である。レーン 1 は、心臓の mRNA を泳動したレーン、レーン 2 は、脳の mRNA を泳動したレーン、レーン 3 は、脾臓の mRNA を泳動したレーン、レーン 4 は、肺の mRNA を泳動したレーン、レーン 5 は、肝臓の mRNA を泳動したレーン、レーン 6 は、骨格筋の mRNA を泳動したレーン、レーン 7 は、腎臓の mRNA を泳動したレーン、レーン 8 は、精巣の mRNA を泳動したレーンであり、矢印 9 は、GAD I I mRNA のバンドの位置を表している。

図6は、組み換え体GAD I I蛋白質と抗GAD I I抗体とを反応させたウエスタンブロットの結果を表す図である。図中の矢印は、GAD I I蛋白質の位置を示し、数値は分子量(kD)を示す。

図7は、ラットの肝臓から抽出したGAD I I蛋白質と実施例5で得た抗GAD I I抗体とを反応させたウエスタンブロットの結果を表す図である。右端のレーンが組み換え体GAD I I蛋白質のレーンであり、ヒスチジntagの分だけ分子量が大きくなっている。中央のレーンは、肝癌組織抽出液のレーンである。左端のレーンは、正常ラット肝臓組織抽出液のレーンである。

#### 発明を実施するための最良の形態

先の出願において示されているように、本発明者らは、ラットの肝臓から、肝臓において顕著に発現されている遺伝子を単離し、該遺伝子の塩基配列を決定しそれをGAD I I遺伝子と命名し、更に該遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列を決定し該蛋白質をGAD I I蛋白質と命名した。本発明者らはまた、該GAD I I遺伝子を大腸菌に導入して形質転換し、組み換えラットGAD I I蛋白質を発現させた。また、本発明者らは、GAD I I遺伝子に対するプローブ及びGAD I I蛋白質に対する抗体を用いて、該遺伝子及び該蛋白質の組織特異的発現を確認した。本発明者らは更に、ヒトライブラリーを用いてヒトGAD I I遺伝子を単離し、該遺伝子の塩基配列を決定し、また該遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列を決定した。

本発明で用いるGAD I I蛋白質の完全長のアミノ酸配列を配列表の配列番号1に、GAD I I遺伝子の完全長の遺伝子配列を配列表の配列番号2に記載する。

データベース検索の結果、本発明のGAD I I蛋白質の一部のアミノ酸配列と相同性がある蛋白質としてGAD (Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America 88, 8754-8758, 1991) 及びCSAD (Biochemica et Biophysica Acta vol.1262, pp79-82(1995)) が存在すること

が判った。

以下、本発明を詳細に説明する。本発明者らは、GAD I I 遺伝子及びGAD I I 蛋白質の発現が、肝癌において正常肝臓のそれに比べて増加しており、それ故、GAD I I 遺伝子又はGAD I I 蛋白質の発現を検出することにより癌の発症をモニターできるという以前に得た知見に基づき、更に簡便な癌のモニター方法を提供する。

本発明者らは、ラットにおいてもヒトと同様に肝癌においてGAD I I 遺伝子及びGAD I I 蛋白質の発現が正常肝臓のそれと比べて増加するという以前に得た知見に基づき、ラットをモデルとしてより簡便な、癌のモニター方法を検討した。その結果、肝癌になったラットの血液中に、抗GAD I I 抗体（自己抗体）が分泌されること、肝癌ラット血液中の抗GAD I I 抗体量は実施例に示すとおりELISA法やウエスタンブロット法により検出可能な量にて存在することを見いだし本発明を完成した。

以下に本発明の好ましい形態を示す。

1. 本発明は、抗GAD I I 抗体を含む生体由来試料をGAD I I 蛋白質と反応させGAD I I 蛋白質-抗GAD I I 抗体複合体を形成する工程、及び該GAD I I 蛋白質-抗GAD I I 抗体複合体を検出する工程を含むことを特徴とする試料中の抗GAD I I 抗体の検出方法である。
2. 本発明はまた、前記抗GAD I I 抗体を含む試料が、血清、リンパ液、腹水滲出液又は細胞間液、好ましくは血清であることを特徴とする前記の検出方法である。
3. 本発明はまた、更に、抗GAD I I 抗体を含む生体由来試料をGAD I I 蛋白質と反応させる前に、GAD I I 蛋白質を固体支持体、例えばメンブラン又はマイクロタイタープレートに固定する工程を含む前記1又は2に記載の抗GAD I I 抗体の検出方法である。
4. 本発明はまた、更に、形成された前記GAD I I 蛋白質-抗GAD I I 抗体

複合体を分離する工程を含む前記1又は2に記載の抗GADII抗体の検出方法である。

5. 本発明はまた、前記GADII蛋白質-抗GADII抗体複合体を検出する工程が、標識された抗Ig抗体、例えば、アルカリフォスファターゼ等の酵素が連結された又は放射線標識された抗Ig抗体を用いることを特徴とする前記のいずれか一つに記載の検出方法である。

6. 本発明はまた、前記GADII蛋白質が組み換え体GADII蛋白質であることを特徴とする前記のいずれか一つに記載の検出方法である。

7. 本発明はまた、前記のいずれか一つの検出方法を用いた癌、特に肝臓の診断方法である。

8. 本発明はまた、GADII蛋白質を含む試薬、好ましくは更に標識された抗Ig抗体、例えば、アルカリフォスファターゼ等の酵素が連結された又は放射線標識された抗Ig抗体を含む試薬を含む抗GADII抗体を検出するためのキットである。

9. 本発明はまた、GADII蛋白質を含む試薬、好ましくは更に標識された抗Ig抗体、例えば、アルカリフォスファターゼ等の酵素が連結された又は放射線標識された抗Ig抗体を含む試薬を含む癌、特に肝臓の診断キットである。

10. 本発明はまた、前記GADII蛋白質が組み換え体GADII蛋白質であることを特徴とする前記8又は9に記載の診断キットである。

以下、本発明を更に詳細に説明する。

本発明でいうGADII蛋白質とは、配列表の配列番号1又は3に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質及び該アミノ酸配列を一部に含む蛋白質を意味する。本発明で言うGADII蛋白質とは更に、試料中の抗GADII抗体と抗原抗体反応を起こす限りは、配列表の配列番号1又は3に記載のアミノ酸配列において、その一部が置換又は欠失されたアミノ酸配列、またはアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列を含む蛋白質、並びに、他の蛋白質と抗原として区別できる限りは配列



表の配列番号1又は3に記載のアミノ酸配列の一部からなるポリペプチドをも含む意味である。

本発明においては、抗GAD I I抗体を検出するために、まずGAD I I蛋白質を用意する。GAD I I蛋白質は、天然のGAD I I蛋白質であってもまた組み換え技術により製造したGAD I I蛋白質であってもよい。しかしながら、天然のGAD I I蛋白質を生体より抽出・精製することは量的、コスト的な制限があるので好ましくは組み換え技術により製造されたGAD I I蛋白質である。また、GAD I I蛋白質の由来種は、検出目的とする抗GAD I I抗体と反応する限りは特に制限されないが、好ましくは検査対象とする種由来のGAD I I蛋白質である。例えば、ヒトの癌の検出のためにヒト由来の試料、例えば血清中に存在する抗GAD I I抗体を検出するために、ヒトGAD I I蛋白質がより好ましいが、前記抗GAD I I抗体と反応するかぎりにはラットのGAD I I蛋白質が満足に用いられ得る。その他、マウスのGAD I I蛋白質等、検査目的の抗GAD I I抗体と交叉反応する限りはGAD I I蛋白質の由来種は特に制限されない。

組み換えGAD I I蛋白質を調製するためには、GAD I I遺伝子をクローニングし、適当な宿主に形質転換して発現させる必要がある。その方法の一例を、後に記す実施例にて詳細に説明する。

本発明において用いる抗GAD I I抗体を含有する試料は、生体由来のもので、自己の抗体を含むものであれば特に限定はされない。例えば、血液及びその調製物である血清、リンパ液、腹腔滲出液、細胞間液等を挙げることができるが、好ましくは容易に入手できかつ生体に過度の負担をかけない血清である。また、本発明で言う生体由来試料は、上記の試料を適当な緩衝液で希釈したもの、ヘパリン等の試薬を加えて加工したもの、ろ過・遠心分離・クロマトグラフィー等の分離方法を用いて粗精製又は精製したものを含む。

本発明においては、次いでGAD I I蛋白質を抗GAD I I抗体と反応させGAD I I蛋白質-抗GAD I I抗体複合体を形成することを特徴とする。GAD

I I 蛋白質-抗GAD I I 抗体複合体を形成するための反応は、抗原抗体反応が起こる条件であれば特に制限はされず、ブロッキングメンブラン上で抗原抗体反応を起こさせる場合、マイクロタイタープレート上で反応を起こさせる場合等、用いる条件に応じて適宜選択可能である。例えば、ブロッキングメンブラン上で反応させる場合は、抗体を含有する試料をPBS等の緩衝液に溶解して、例えば室温で反応させることができる。夾雑物による反応が起こる場合は、スキムミルクやアルブミン等の蛋白質を含有する溶液で試料を希釈することにより、バックグラウンドを良好にすることができる。また、反応温度は、例えば夾雑物による抗原蛋白質の分解等、比較的高い温度にて反応を行うことが不都合である場合は、低温、例えば4℃にて反応を行うことができる。反応時間は、抗原抗体反応が満足に起こる限りは特に制限されず、たとえば30～60分間を用いることができる。反応の停止は特に要求されず、たとえばメンブランを用いる場合はメンブランを例えばPBSで洗浄する、マイクロタイタープレートを用いる場合は例えば試料を除去した後ウェルをPBSで洗浄する等の方法により、試料を除去することにより行うことができる。

本発明においては、GAD I I 蛋白質-抗GAD I I 抗体を形成するに先だって、GAD I I 蛋白質を固体支持体に固定することができる。固体支持体としては、たとえばメンブラン、マイクロタイタープレート等を挙げることができる。メンブランを用いる場合は、GAD I I 蛋白質を含有する溶液を直接メンブランに滴下して固定させる方法（いわゆるドットプロット法）や実施例に示すウエスタンプロット法等を用いることが可能である。また、GAD I I 蛋白質をマイクロタイタープレートに固定する方法は、GAD I I 蛋白質を含有する溶液をウェルに入れ固定化する方法、ウェルに前もって調製したおいた抗GAD I I 抗体を入れ該抗体をウェルに固定した後GAD I I 蛋白質を含有する溶液を加えてGAD I I 蛋白質を固定化する方法等がある。マイクロタイタープレートを用いる前者の方法は、いわゆるELISA法として、後者の方法はサンドイッチELIS

A法として用いられる。本願発明で用いるGAD I I蛋白質は容易にプレートに固定できるので、ELISA法として用いるのが、抗GAD I I抗体を固定する必要がなく好ましい。このように、GAD I I蛋白質-抗GAD I I抗体複合体形成に先だってGAD I I蛋白質を固定しておくことにより複合体の分離が容易となる。

また、複合体の形成に先だってGAD I I蛋白質を固定しておかない場合も、溶液中やゲル中で両者を混合すると免疫沈降反応により抗原抗体複合体が形成される。この場合、GAD I I蛋白質-抗GAD I I抗体複合体の検出に先だって、複合体を他の夾雑物から分離するのが好ましい。分離方法としては、例えば、遠心分離やGAD I I蛋白質に対するアフィニティクロマトグラフィーを挙げることができる。具体的には、前もって調製した、抗GAD I I抗体を例えばゲル等の固体支持体に保持しておき、それに対して複合体を含有する溶液をアプライすれば、複合体のみを回収することができる。

本発明においては次いで、GAD I I蛋白質-抗GAD I I抗体複合体の検出を行う。検出方法は特に制限はされないが、例えば、上記のドットブロット法、ウェスタンブロット法、ELISA法、サンドイッチELISA法を用いた場合は、試料が由来するヒトを含む動物種のIgに結合しうる標識した抗Ig抗体を用いて検出することが可能である。抗Ig抗体の標識方法としては、アルカリフォスファターゼ、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ等の酵素を抗体に連結する方法、放射線標識をする方法等を挙げることができる。酵素を用いた場合は、検出は、呈色反応により行うことができる。また、ビオチン結合抗Ig抗体を反応させた後アビジン結合物質と反応させる等の多段階反応を用いてもGAD I I蛋白質-抗GAD I I抗体複合体を検出でき、これらの多段階反応も本発明の概念に含まれ、多段階反応で用いるビオチン結合抗Ig抗体も本願発明で言うところの標識した抗Ig抗体に含まれる。

以下本発明を実施例により説明するが本発明は以下の実施例には限定されない。

本発明で用いる組み換えGAD I I蛋白質の製造のために、GAD I I遺伝子の分離、同定及び大腸菌への形質転換、発現をまず行った。なお、酵素に関しては、特に記載がない限り宝酒造社製のものを、添付の使用説明書に従って用いた。

(実施例1) 肝癌で発現が増加する蛋白質及びその遺伝子

## 1. 肝癌で発現の増加する蛋白質をコードする遺伝子の単離

### 1. 肝癌ラットの作製

肝癌ラットは、ソルトファーバー法(『Nature』Vol. 263、1976年、pp 701~703)を基として作製した。実際には、5週齢のウィスター系ラット(船橋農場製)にジエチルニトロサミン(DEN)を腹腔内投与し、二週間後2-アミノアセチルフルオレン(AAF)を0.02%含むM飼料(オリエンタル酵母製)の経口投与を開始し、さらにその一週間後再生肝手術を施した。DEN投与後12、24、48時間及び1、3、5、7カ月後に肝臓を摘出し、後のRNA調製に使用した。また、各ラットより採血を行い、常法にて血清を取得した。DNE投与のラット群については、投与後1、3、5及び7カ月後にそれぞれ採血を行った。血清は、-80℃にて保存し、後のウェスタンブロットの実験に用いた。

また比較対照として、正常な増殖を示す再生肝臓を、再生肝手術後12、24、48時間後に肝臓を摘出することで用意し、のちの解析に使用した。

### 2. RNAの調製

全RNAは、『Methods in enzymology』Vol. 154 (academic Press Inc.、1987年) pp 3~28に記載の方法を基として調製した。実際には、

(1) 各肝臓を3gずつ液体窒素中で粉碎し、100mlの5.5M GTC溶液(グアニジンチオシアネート5.5mM、N-ラウロニルサルコシン0.5%、25mMクエン酸ナトリウム、pH7.0)に加え、ポッター型ホモジナイザーでホモジネートした。

(2) 溶液を、3000 rpm、10分間遠心分離した後、上清液をSW28 スイングローター用遠心管（ベックマン製）に加えておいた比重1.6 g/ml のセシウムトリフルオロ酢酸溶液（セシウムトリフルオロ酢酸（ファルマシア製）50%、100 mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（EDTA）（pH 7.0））12 mlに重層し、SW28 スイングローターを用いて25000 rpm、24時間、15℃で分離を行った。

(3) 沈殿物を、600  $\mu$ lの4M GTC溶液に溶かし、15000 rpmで遠心分離し、溶液部分を回収した。1M酢酸を15  $\mu$ l、エタノール450  $\mu$ lを加え、15000 rpm、10分間遠心分離し、沈殿を回収した。

(4) この沈殿を、適当量（約3 ml）のTE溶液（1 mM Tris-Cl（pH 7.5）、1 mM EDTA）に溶かし（溶けるまでTE溶液を加えた）、15000 rpmで遠心分離し、溶液部分を回収した。

(5) 溶液と同量のフェノール/クロロホルムを混合し、15000 rpm、10分間遠心分離し、溶液部分を回収した。

(6) 溶液に1/10容量の3M酢酸ナトリウム（pH 5.2）を加え、2.5倍量のエタノールを加え、-20℃で20分間放置後、15000 rpmで遠心分離し、沈殿を70%エタノールで洗浄後、乾燥させ、適当量のTE溶液に溶かし、-80℃で保存した。各肝臓から5~7 mgの全RNAが得られた。

(7) polyA RNAの精製は、oligotex dT30 super<sup>TM</sup>（日本ロッシュ製）を用いて、取扱説明書の通りに行った。用いた全RNAの量は一回当たり1 mgで、oligotex dT30 super<sup>TM</sup> 750  $\mu$ lを用いてpolyA RNAの精製を行った。各肝臓において、1 mgの全RNAから約20  $\mu$ gのpolyA RNAが得られた。

### 3. cDNAサブトラクション

これは、原らの方法（『Analytical Biochemistry』Vol. 214、1993年、pp 58~64）に準じて行った（この文献は引

用することにより本明細書の一部である)。実際には、

(1) 用いた材料となる poly A RNA は、7 カ月肝癌、及び正常肝臓のもので、各 15  $\mu$ g を用いた。

① 該 poly A RNA は、それぞれ oligotex dT30 super<sup>TM</sup> に吸着させた後、その状態で cDNA の合成反応を行った。合成反応の条件は文献の通りに行った。

② 肝癌の cDNA-oligotex dT30 super<sup>TM</sup> には、ターミナルデオキシトランスフェラーゼ (宝酒造製) で poly dC tail を付加し、EcoRI-(dG)<sub>15</sub> プライマーと Taq ポリメラーゼ (パーキンエルマー製) でセンス鎖の cDNA を合成した。

このセンス鎖 cDNA と正常肝臓の cDNA-oligotex dT30 super<sup>TM</sup> の間で該 cDNA サブトラクション反応を行った。

③ 反応後得られた cDNA 溶液は EcoRI-(dG)<sub>15</sub> 及び XhoI-(dT)<sub>30</sub> の両プライマーを用いて PCR 反応 (『Current Protocols in Molecular Biology』 (1987 年、Green e Publishing Associates and Wiley-Interscience 社) Chapter 15 に記載の方法に準じる) で増幅した。PCR の条件は、以下の組成の溶液で、1 サイクルを 94℃ で 90 秒、次に 55℃ で 2 分、次に 72℃ で 3 分反応させることとして、25 サイクル行った。

cDNA 溶液	69 $\mu$ l
10x Taq 緩衝液 (パーキンエルマー製)	10 $\mu$ l
1.25mM dNTP	16 $\mu$ l
EcoRI-(dG) <sub>15</sub> プライマー (2 $\mu$ g/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
XhoI-(dT) <sub>30</sub> プライマー (2 $\mu$ g/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Taq ポリメラーゼ (パーキンエルマー製) (5 u/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
	計 100 $\mu$ l

(2) ①サブトラクション処理後、得られた遺伝子ライブラリーをEcoRI (宝酒造製) で切断した。反応系は次の条件とした。

遺伝子溶液	10 $\mu$ l
10xH buffer	10 $\mu$ l (宝酒造製)
EcoRI	5 $\mu$ l (宝酒造製)
滅菌水	75 $\mu$ l
計100 $\mu$ l	

反応温度 37℃

反応時間 一晚

②EcoRI切断後、100  $\mu$  lのフェノール/クロロホルムを混合し、15000rpmで遠心分離し、水溶液部分を回収した。この溶液に10  $\mu$  lの3M酢酸ナトリウム(pH5.2)を加え、250  $\mu$  lのエタノールを加えた後、15000rpmで遠心分離し沈殿を回収した。

③回収した沈殿を70%エタノール1mlで洗浄し、乾燥させた後、75  $\mu$  lの滅菌水に溶解させた。これを下記組成の液として37℃で一晩反応させ、XhoIで切断した。

遺伝子溶液	75 $\mu$ l
1%BSA	10 $\mu$ l (宝酒造製)
10xH buffer	10 $\mu$ l (宝酒造製)
XhoI	5 $\mu$ l (宝酒造製)
計100 $\mu$ l	

反応温度 37℃

反応時間 一晚

(3) 100  $\mu$  lのフェノール/クロロホルムを混合し、15000rpmで遠心分離し、水溶液部分を回収した。この溶液に10  $\mu$  lの3M酢酸ナトリウム

(pH 5.2)を加え、250  $\mu$ lのエタノールを加えた後、15000 rpmで遠心分離し沈殿を回収し、70%エタノール1mlで沈殿を洗浄し乾燥した後、100  $\mu$ lの滅菌水に溶解させ、遺伝子ライブラリー溶液を調製した。

#### 4. サブトラクション後の遺伝子のベクターへの導入

(1) pBluescript IIベクター (ストラタジーン製) をEcoRI, XhoI (宝酒造製) で切断した。切断条件は、3. (2) で示した条件を用いた。

(2) 切断されたpBluescript IIベクターの切断端の脱リン酸化をbacterial alkaline phosphatase (宝酒造製) を用いて、65℃で1時間反応させて行った後、100  $\mu$ lのフェノール/クロロホルムを混合し、15000 rpmで遠心分離し、水溶液部分を回収した。

(3) この溶液に10  $\mu$ lの3M酢酸ナトリウム (pH 5.2)を加え、250  $\mu$ lのエタノールを加えた後、15000 rpmで遠心分離し沈殿を回収し、70%エタノール1mlで沈殿を洗浄し乾燥した後、100 ng/ $\mu$ lになるように滅菌水に溶解させた。

(4) 3. で得られた遺伝子ライブラリー溶液と、切断、脱リン酸化を行ったpBluescript IIベクターをligation pack™ (日本ジーン製) の使用要領に従い、混合、反応させることでライブラリーの各遺伝子をベクターに挿入した。

#### 5. サブトラクション後の遺伝子の $E. coli$ JM109への導入

常法に従い、4. (4) で反応させた反応液を全て、 $E. coli$  JM109のコンピテントセル (宝酒造製) に混合し、氷上で30分間、42℃で45秒間、氷上で3分間反応させた後、SOC培地900  $\mu$ lを加え、37℃、1時間置き、ベクターを $E. coli$  JM109に導入した。その後、 $E. coli$  JM109を回収した。



## 6. 遺伝子の抽出

(1) この大腸菌を、下記の組成のLB寒天培地に撒き、一晚培養することでコロニーを形成させた。

LB寒天培地の組成

アンピシリン (和光純薬製)  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$

IPTG (宝酒造製)  $0.1 \text{ mM}$

X-gal (宝酒造製)  $0.004\%$

形成されたコロニーのうち、白色のコロニーを選択して後の遺伝子のスクリーニングに用いる種菌とした。

(2) 種菌を2000種類選択し、各々をアンピシリンを $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 含む2mlのLB液体培地で培養した後、『Molecular Cloning Second Edition』(Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年) Chapter 1に記載のアルカリ法で遺伝子を抽出した。

## 7. ドットプロットスクリーニング

(1) 抽出した遺伝子は、Bio Dot (バイオラッド製) を用いて各々2枚のナイロンメンブラン (ミリポア製) に結合させ、水酸化ナトリウム水溶液で遺伝子を変性させた後、UVクロスリンカー (ストラタジーン製) により固定を行った。遺伝子の変性は以下の条件で行った。

①  $0.1 \text{ M}$  水酸化ナトリウム、 $0.15 \text{ M}$  塩化ナトリウム溶液に20秒反応させ

② その後、 $0.2 \text{ M}$  Tris-Cl ( $\text{pH} 7.5$ )、 $0.15 \text{ M}$  水酸化ナトリウム溶液と2分間反応させた。

③ その後、 $2 \times \text{SSC}$  で2分間反応させた。

(2) 2. で作製した肝癌 poly A RNA 及び正常肝臓 poly A RNA より、放射性CTP ( $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ ) (アマシャム製) を用いてAMV 逆転写酵素 (生化学工業社製) により逆転写反応を行うことで、それぞれの po

ly A RNAからcDNAプローブを作製した。

(3) (1) でナイロンメンブランに固定した遺伝子と (2) で作製した cDNA とを以下の条件でハイブリダイゼーションさせた。

① プレハイブリダイゼーション条件

5 x SSC

5 x Denhardt's

0. 1Mピロリン酸ナトリウム (pH 6. 8)

50%ホルムアミド

0. 5% SDS

100  $\mu$ g/ml 酵母 tRNA

100  $\mu$ g/ml 変性サケ精子DNA

反応温度 42°C

反応時間 1 時間

② ハイブリダイゼーション条件

5 x SSC

5 x Denhardt's

0. 1Mピロリン酸ナトリウム (pH 6. 8)

50%ホルムアミド

0. 5% SDS

100  $\mu$ g/ml 酵母 tRNA

100  $\mu$ g/ml 変性サケ精子DNA

(2) で作製した cDNA プローブ (5 x 10<sup>5</sup> cpm/ml)

反応温度 42°C

反応時間 16 時間

(4) その後、ナイロンメンブランを各々 500 ml の 2 x SSC (0. 1% SDS を含む)、0. 2 x SSC、0. 1 x SSC の溶液の順番でそれぞれ 30

分間ずつ60℃で洗浄した後、オートラジオグラフィーを行った。得られたオートラジオグラフィーより、正常肝臓のcDNAプローブとの結合量に比べ肝癌のcDNAプローブとの結合の多い遺伝子を選択した。全部で少なくとも31個の遺伝子を確認し、このうちの1つを選択し、以下の実験に用いた。

#### 8. 塩基配列の決定

塩基配列の決定は、『Molecular Cloning Second Edition』chapter 13に記載の方法に準じて行った。実際には、得られた肝癌のcDNAプローブとの結合量の多い遺伝子の塩基配列の決定は、T7 sequence kit™ (ファルマシア製) を用いてジデオキシターミネーター法でpBluescript II上に挿入した遺伝子部分の配列を読み取った。

#### 9. ホモロジー解析

決定された遺伝子の塩基配列をDDBJ (DNA Data Base of Japan) のデータバンクに照会することで、ホモロジー解析を行った。その結果、この遺伝子は、ホモロジーの見つからない新規遺伝子であることが判明した。この遺伝子をGAD II遺伝子と命名した。その遺伝子について、該遺伝子が完全長であるかどうか確認するために以下の解析を行った。

#### 10. cDNAライブラリーの作製

DEN投与後7カ月の肝癌組織より抽出したpolyA RNA 4μgからファルマシア製タイムセイバーcDNAシンセシスキット™を用いて、取扱説明書にしたがってcDNA合成を行った。以下にその概要を説明する。

(1) ランダムプライマーを使用し、逆転写反応、DNAポリメラーゼによるDNA合成反応により二本鎖cDNAを合成し、このcDNAの両端にNot I / EcoRIアダプターを付加するためT4 DNAライゲース処理及びポリヌクレオチドキナーゼ処理を行った。これにより両端にEcoRI制限酵素切断部位を有するcDNAを得た。

(2) このcDNAを、 $\lambda$ gt11クローニングベクター(ファルマシア製)にT4DNAリガーゼを用いて挿入し、GIGAPACK Gold™(ストラタジーン製)を用いてパッケージングを行い、 $\lambda$ ファージの中にcDNAを導入し、完全長遺伝子の単離に用いた。

#### 11. 完全長遺伝子の単離

完全長遺伝子の単離は『Molecular Cloning Second Edition』Chapter 2に記載の方法に準じて行った。以下にその概要を示す。

(1) 10. で作製したcDNAを含むライブラリーをY1090 $\phi$ -大腸菌に接触させた後、0.7%寒天を含むNZY培地に混合し、1.5%寒天を含むNZY培地プレートに撒いた。42℃で6時間培養を行うことでcDNAを大量に含むプラークを形成させた後、このプレート上にニトロセルロースフィルター(イモビロン™(ミリポア製))をのせ形成されたプラークを転写した。

(2) 水酸化ナトリウムでこのフィルター上のプラーク中のcDNAを変性させた。変性の条件は7. (1)に記載の条件と同じで行った。

(3) 変性させたcDNAを75℃で2時間熱処理して固定し、ハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーションに用いたプローブには、8. で塩基配列を決定したGADII遺伝子の一部分をランダムラベリング(ベーリンガーマンハイム製のランダムラベリングキットを使用した)で $^{32}$ P-dCTP標識したものをを用いた。ハイブリダイゼーションの条件及び洗浄の条件は文献(Current Protocols in Molecular Biology (Jhon Wiley & Sons, Inc.) Chapter 6)に記載の条件にしたがった。

(4) ハイブリダイゼーションの結果、フィルターに固定したcDNAから得られたポジティブシグナルに対応するプラークからプローブ配列より長い配列を有する遺伝子を得た。

上記の操作の結果、完全長のGADII遺伝子を得た。

(実施例2) 肝癌特異的な蛋白質GADIIのアミノ酸配列及び該蛋白質をコードする遺伝子の決定

# 1. ラットGADII

## 1. 遺伝子の大量調製

実施例1で得たラットのGADII遺伝子について以下の操作を行い、遺伝子を大量調整した。

(1) 実施例1の11. (4)で完全長のGADII遺伝子を含むと判ったブランクに対応するNZY寒天培地上に形成させたブランクから回収したスファージをSM溶液に懸濁した。

(2) (1)の懸濁液50 $\mu$ lとY1090 $\gamma$ -大腸菌20 $\mu$ lを混合し、37 $^{\circ}$ C、15分間放置した。

(3) その後、100 $\mu$ g/mlアンピシリンを含む10ml NZY培地に(2)で混合した溶液を移し、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養し、菌が溶菌したことを確認した。

(4) 8000rpm、5分間遠心分離し、上清を回収した。

(5) 該上清に、5M NaClを1ml、ポリエチレングリコール6000を1.1gを加え、溶かした。

(6) 該溶液を氷上に1時間置き、その後10000rpm、4 $^{\circ}$ Cで20分間遠心分離を行った。

(7) 沈殿を回収し、700 $\mu$ lのSM溶液に懸濁した。

(8) クロロホルムを500 $\mu$ l加えて攪拌し、残った大腸菌を溶かした。

(9) 5000rpm、10分間遠心分離し、水層を回収した。

(10) これに、1mg/ml RNaseA、5mg/ml DNaseI (共にシグマ製)を各1 $\mu$ lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間放置したのち、20%ポ

リエチレングリコール6000 (0.8M NaCl) を600 $\mu$ l 加え、氷上に30分間放置した。

(11) 4℃で、15000rpm、20分間遠心分離した後、沈殿を回収した。

(12) この沈殿に500 $\mu$ lのSM溶液、50 $\mu$ lの5M NaCl、50 $\mu$ lの0.5M EDTAを加え、更に、400 $\mu$ lのフェノールを加えて攪拌し、ファージを溶かしてcDNAを遊離させた。

(13) 該溶液を室温で15000rpm、5分間遠心分離した後、水層を回収した。該液に1mlのエタノールを加え、15000rpm、20分間遠心分離し、液層を捨てた。

(14) 70%エタノール1mlで沈殿を洗浄し、100 $\mu$ lのTE溶液 (Tris-Cl pH8.0 10mM、1mM EDTA) に沈殿を溶かし、DNA溶液を得た。

## 2. GADII遺伝子のベクターへの挿入

GADII遺伝子を以下の操作により、ベクターに挿入した。

(1) DNA切断の系を以下のようにし、制限酵素EcoRI (宝酒造製) によるDNA切断を行った。

DNA溶液 (1. で調製したもの)	20 $\mu$ l
EcoRI (宝酒造製)	2 $\mu$ l
RNaseA (日本ジーン製)	1 $\mu$ l
10xH buffer (宝酒造製)	10 $\mu$ l
滅菌水	67 $\mu$ l
合計100 $\mu$ l	

反応温度 37℃

反応時間 4時間

(2) その後、0.7% NuSieve™ GTG アガロース (宝酒造製) 電気泳動を行い、2.1 kbp 付近の DNA を切り出し、この DNA を GENE CLEAN II™ (フナコシ製) を用いて取扱説明書の通りに DNA を回収した。

(3) DNA を組み込む pBluescript II (ストラタジーン製) を EcoRI で切断後脱リン酸化を行った。

① EcoRI での切断は、以下の系で行った。

pBluescript II (1 $\mu$ g / $\mu$ l)	2 $\mu$ l
10xH buffer	2 $\mu$ l
EcoRI	2 $\mu$ l
滅菌水	14 $\mu$ l
合計	20 $\mu$ l

反応温度 37℃

反応時間 一晚

② その後、2  $\mu$ l 1M Tris pH8.0 を加え、1  $\mu$ l Bacterial Alkaline Phosphatase (宝酒造製) を加え、65℃ で 1 時間放置した。

③ その後、フェノール/CHCl<sub>3</sub> 抽出を常法に従い 2 回行い酵素を失活させた後、エタノール沈殿により精製した後、TE 溶液にて 100  $\mu$ g /  $\mu$ l に溶かした。

④ ②) で得られた DNA と、③) で得られた pBluescript II を、以下の系で反応させ、DNA をベクターに挿入した。

DNA (②) で調製したもの)	5 $\mu$ l
pBluescript II EcoRI 切断物 (③) で調製したもの)	1 $\mu$ l
10倍ライゲーションバッファー (日本ジーン製)	2 $\mu$ l

T4 リガーゼ (日本ジーン製)	1 $\mu$ l
滅菌水	11 $\mu$ l
	合計 20 $\mu$ l

反応温度 16℃

反応 2 時間

### 3. 遺伝子の大腸菌への導入

2. で作製した GAD I I を挿入したベクターを、それぞれ常法に従い反応液を全て、E. coli JM109 コンピテントセル (宝酒造製) に混合し、氷上で 30 分間、42℃ で 45 秒間、氷上で 3 分間反応させた後、SOC 培地 900  $\mu$  l を加え、37℃、1 時間置き、ベクターを E. coli JM109 に導入した。その後、E. coli JM109 を回収した。

なお、この GAD I I 遺伝子を導入した組み換え体大腸菌を通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に寄託 (受託番号 FERM P-15165) し、平成 8 年 9 月 11 日国際寄託に移管した (受託番号 FERM BP-5664)。

### 4. 遺伝子の塩基配列の決定

(1) 3. で回収した E. coli JM109 を LB 寒天培地 (100  $\mu$  g / ml アンピシリン、0.1 mM IPTG、0.004% X-gal 含有) に撒き、37℃ で 16 時間培養した。

(2) 形成されたコロニーのうち、白色のコロニーを 2 ml LB 培地 (100  $\mu$  g / ml アンピシリン含有) に植え、37℃ で 16 時間培養した

(3) その後、12000 rpm、1 分間遠心分離して集菌し、Magic Miniprep™ (プロメガ製) を用いて使用説明書に従いプラスミド DNA 溶液を回収した。



(4) 回収したDNAをT7シーケンシングキット（ファルマシア製）を用いて使用説明書に従い、シーケンスし、全塩基配列を決定した。GAD I I 遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号2に示す。得られたGAD I I 遺伝子配列に関して、データベースを用いてホモロジー検索をしたところ、一部においてホモロジーがある配列としてCSAD遺伝子が検索された。CSAD遺伝子は、Biochemical et Biophysica Acta vol.1262, pp79-82(1995)に報告されている。

#### 5. アミノ酸配列の決定

4. で決定した塩基配列から、GAD I I のアミノ酸配列を決定した。GAD I I のアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

### I I. ヒトGAD I I

#### 1. 完全長遺伝子の単離

完全長遺伝子の単離は『Molecular Cloning Second Edition』Chapter 2に記載の方法に準じて行った。以下にその概要を示す。

(1) cDNAライブラリーはCLONTECH社のHuman Liver 5' -Stretch plus cDNAライブラリーを使用した。このcDNAライブラリーをC600-大腸菌に接触させた後、0.7%寒天を含むNZY培地に混合し、1.5%寒天を含むNZY培地プレートに撒いた。42℃で6時間培養を行うことでcDNAを大量に含むブランクを形成させた後、このプレート上にニトロセルロースフィルター（イモビロン™、ミリポア製）を載せ、形成されたブランクを転写した。

(2) 水酸化ナトリウムでこのフィルター上のブランク中のcDNAを変性させた。変性の条件は実施例1の7. (1)に記載の条件と同じで行った。

(3) 変性させたcDNAを75℃で2時間熱処理して固定し、ハイブリダ

イゼーションに用いた。ハイブリダイゼーションに用いたプローブには、実施例2のI. で塩基配列を決定したラットGAD I I遺伝子のうち配列表の配列番号2の65番目のAから611番目のGまでをランダムラベリング（ベーリンガーマンハイム製のランダムラベリングキットを使用した）で $^{32}\text{P}$ -dCTP標識したものを用いた。ハイブリダイゼーションの条件及び洗浄の条件は文献（Current Protocols in Molecular Biology (Jhon Wiley & Sons, Inc.) Chapter 6）に記載の条件にしたがった。

（4）ハイブリダイゼーションの結果、フィルターに固定したcDNAから得られたポジティブシグナルに対応するブランクから完全長のヒトGAD I I遺伝子を得た。

## 2. ヒトGAD I I遺伝子の塩基配列及びヒトGAD I Iのアミノ酸配列の決定

ヒトGAD I I遺伝子の塩基配列の決定はI. と同様の方法で行った。すなわち、以下のようにして行った。

### （1）遺伝子の大量調製

1) 1. （1）でNZY寒天培地上に形成させたブランクから回収したスファージをSM溶液に懸濁した。

2) 1) の懸濁液50  $\mu\text{l}$  とC600-大腸菌20  $\mu\text{l}$  を混合し、37℃、15分間放置した。

3) その後、10ml NZY培地に2) で混合した溶液を移し、37℃で6時間培養した。

4) 8000 rpm、5分間遠心分離し、上清を回収した。

5) 該上清に、5M NaClを1ml、ポリエチレングリコール6000を1.1gを加え、溶かした。

6) 該溶液を氷上に1時間置き、その後10000 rpm、4℃で20分間

遠心分離を行った。

7) 沈殿を回収し、700  $\mu$ l のSM溶液に懸濁した。

8) クロロホルムを500  $\mu$ l 加えて攪拌し、残った大腸菌を溶かした。

9) 5000 rpm、10分間遠心分離し、水層を回収した。

10) これに、1mg/ml RNase A、5mg/ml DNase I (共にシグマ社製) を各1  $\mu$ l ずつ加え、37℃で1時間放置したのち、20% ポリエチレングリコール6000 (0.8M NaCl) を600  $\mu$ l 加え、氷上に30分間放置した。

11) 4℃で、15000 rpm、20分間遠心分離した後、沈殿を回収した。

12) この沈殿に500  $\mu$ l のSM溶液、50  $\mu$ l の5M NaCl、50  $\mu$ l の0.5M EDTAを加え、更に、400  $\mu$ l のフェノールを加えて攪拌し、ファージを溶かしてcDNAを遊離させた。

13) 該溶液を室温で15000 rpm、5分間遠心分離した後、水層を回収した。該液に1mlのエタノールを加え、15000 rpm、20分間遠心分離し、液層を捨てた。

14) 70%エタノール1mlで沈殿を洗浄し、100  $\mu$ l のTE溶液 (Tris-Cl pH8.0 10mM、1mM EDTA) に沈殿を溶かし、DNA溶液を得た。

## (2) ヒトGAD II遺伝子のベクターへの挿入

ヒトGAD II遺伝子を以下の操作により、ベクターに挿入した。

1) DNA切断の系を以下のようにし、制限酵素EcoRI (宝酒造社製) によるDNA切断を行った。

DNA溶液 (1. で調製したもの)	20 $\mu$ l
--------------------	------------

EcoRI (宝酒造社製)	2 $\mu$ l
---------------	-----------

RNase A (日本ジーン社製)	1 $\mu$ l
10xH buffer (宝酒造社製)	10 $\mu$ l
滅菌水	67 $\mu$ l
合計	100 $\mu$ l

反応温度 37℃

反応時間 4 時間

2) その後、0.7% NuSieve™ GTG アガロース (宝酒造社製) 電気泳動を行い、2.1 kbp 付近の DNA を切り出し、この DNA を GENE CLEAN II™ (フナコシ社製) を用いて取扱説明書の通りに DNA を回収した。

3) DNA を組み込む pBluescript II (ストラタジーン社製) に EcoRI で切断後脱リン酸化を行った。

① EcoRI での切断は、以下の系で行った。

pBluescript II (1 $\mu$ g / $\mu$ l)	2 $\mu$ l
10xH buffer	2 $\mu$ l
EcoRI	2 $\mu$ l
滅菌水	14 $\mu$ l
合計	20 $\mu$ l

反応温度 37℃

反応時間 一晚

② その後、2  $\mu$ l 1M Tris pH8.0 を加え、1  $\mu$ l Bacterial Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) を加え、65℃ で 1 時間放置した。

③ その後、フェノール/CHCl<sub>3</sub> 抽出を常法に従い 2 回行い酵素を失活させた後、エタノール沈殿により精製した後、TE 溶液にて 100  $\mu$ g /  $\mu$ l に溶か

した。

④2) で得られたDNAと、③で得られたpBlue script IIを、以下の系で反応させ、DNAをベクターに挿入した。

DNA ( (2) で調製したもの)	5 $\mu$ l
pBlue script II EcoRI切断物 (③で調製したもの)	1 $\mu$ l
10倍ライゲーションバッファー (日本ジーン社製)	2 $\mu$ l
T4リガーゼ (日本ジーン社製)	1 $\mu$ l
滅菌水	11 $\mu$ l
合計	20 $\mu$ l

反応温度 16℃

反応 2時間

#### (3) 遺伝子の大腸菌への導入

(2) で作製したヒトGAD IIを挿入したベクターを、それぞれ常法に従い反応液を全て、E. coli JM109コンピテントセル (宝酒造社製) に混合し、氷上で30分間、42℃で45秒間、氷上で3分間反応させた後、SOC培地900  $\mu$  lを加え、37℃、1時間置き、ベクターをE. coli JM109に導入した。その後、E. coli JM109を回収した。

なお、このヒトGAD II遺伝子を導入した組み換え体大腸菌をhCSAD2と名付け通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号) に寄託 (受託番号FERM P-15762) し、平成8年9月4日国際寄託に移管した (受託番号 FERM BP-5653)。

#### (4) 遺伝子の塩基配列の決定

1) (3) で回収したE. coli JM109をLB寒天培地 (100  $\mu$  g /mlアンピシリン、0.1mMIPTG、0.004%X-gal含有) に撒き、37℃で16時間培養した。

2) 形成されたコロニーのうち、白色のコロニーを2 ml LB培地 (100  $\mu$ g/ml アンピシリン含有) に植え、37℃で16時間培養した

3) その後、12000 rpm、1分間遠心分離して集菌し、Magic Miniprep™ (プロメガ製) に従いプラスミドDNA溶液を回収した。

4) 回収したDNAをDNAシーケンシングキット (ダイターミネーター法、パーキンエルマー社製) を用いてその取扱説明書に従い、シーケンスし、全塩基配列を決定した。塩基配列を配列表の配列番号4に示す。なお、ラットGADII遺伝子とのホモロジー (ラットに対するヒトのホモロジー) は、遺伝子全長で73%、蛋白質コード部分で83%である。ホモロジー計算は、DINASSIS ver 3.0 (日立ソフトウェアエンジニアリング社製) のマキシマムマッチングを用いて行った。

#### (5) アミノ酸配列の決定

(4) で決定した塩基配列から、ヒトGADIIのアミノ酸配列を決定した。アミノ酸配列を配列表の配列番号3に示す。ラットGADIIとのホモロジー (ラットに対するヒトのホモロジー) は85%である。

#### (実施例3) 肝癌の遺伝子発現レベルでの診断の可能性の確認

1. ラットGADII遺伝子のノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析

GADII遺伝子のノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析を、『Current Protocols in Molecular Biology』(1987年、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience社) Chapter 4に記載されているホルムアルデヒド変性ゲル電気泳動を用いる方法に従って行った。用いたpolyA RNAの量は、各サンプルにつき500 ngで、①正常肝臓

及びDEN投与後7カ月の肝癌のpoly A RNAを用いたもの、②実施例1のI. 2. で調製した肝癌試料の全てのpoly A RNAを用いたものの2種類について行った。

(1) 実施例2のI. 2. でpBluescript II上にのせたGAD II遺伝子を制限酵素処理にて、ベクターから切り出した。

(2) その後、制限酵素処理液をアガロースゲル電気泳動にかけて、目的とするGAD II遺伝子を分離した。

(3) (2) で分離したGAD II遺伝子をGENE CLONE II™ (フナコシ製) を用いて精製した。

(4) 精製したGAD II遺伝子をランダムプライムドDNAラベリングキット(ベーリンガーマンハイム製)を用いて製品取扱説明書に従い、 $\alpha$ -P<sup>32</sup> dCTP (アマシャム製)を用いて<sup>32</sup>P-dCTP標識したGAD II遺伝子プローブを作製した。

(5) (4) で作製したプローブを用いて、まず正常肝臓と7カ月肝癌を用いた系において、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析を行った。この結果、肝癌で有意に増加する遺伝子としてGAD II遺伝子が検出された。これよりGAD II遺伝子を用いることで、肝癌と正常肝臓の識別が可能となること、すなわち、肝癌の発症のモニターが可能となること、さらには肝癌の診断が可能であることが判明した。

(6) 次に、同じプローブを用いて、実施例1のI. 2で調製した肝癌試料全てのpoly A RNAを用いたものを使用した系でノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析を行った。結果を図3に示す。図3にて、矢印は、GAD II mRNAのバンドの位置を示す。図より、発癌誘導に伴いGAD II遺伝子の有意な増加が見られることが判明した。このことから、GAD II遺伝子を用いて発癌初期の肝癌の識別も可能であること、すなわち肝癌の進行程度のモニターが可能であること、さらには肝癌の早期診断が可能であることが判明し

た。しかしながら、この方法では、生体より肝臓組織を採取してmRNAを抽出しかつmRNAを増幅しなければならない。

#### (実施例4) GAD I Iの発現

本発明で用いる組み換え体GAD I I蛋白質を調製するため、及び抗GAD I I抗体を得るために組み換え体GAD I I蛋白質を以下のようにして製造した。

##### 1. ラットGAD I I遺伝子の大量調整

###### (1) 組み換えベクターの作製

ラットGAD I I遺伝子を図4に示されるヒスチジンタグを導入したpET3aベクターに組み込んだ。以下にその詳細を記す。

①まず、実施例2のI. 2. で作製したGAD I I遺伝子を挿入したpBluescript IIベクターを、PCR法(『Current protocols in molecular biology』(Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987) chapter 15に記載)により、次の式(1)及び式(2)の塩基配列のプライマーを用いて、GAD I I遺伝子の第一メチオニン部分をコードする塩基配列の前にEcoRIサイトを導入して増幅した。

5' GAA TTC CCC ATG GCT GAC TCA AAA CC  
A CTC AGA A 3' . . . 式(1)

5' GCA CTG ACC AGA AAT GGC AC 3'  
. . . 式(2)

②増幅された遺伝子をEcoRI, SacIで切断して切り出した。

③別に、GAD I I遺伝子を挿入したpBluescript IIのGAD I I遺伝子のC末端側に存在する残りの部分をBglIIで切断した。その後、クレノーフラグメントで平滑化した後、SacIで切断して遺伝子を切り出した。

④②で切り出した遺伝子と③で切り出した遺伝子とをLigation Pa



ck (日本ジーン製) を用いてその取扱説明書に従い連結し、GADII 遺伝子を作製した。

⑤図4に示すヒスチジンタグを導入した pET3a ベクターを EcoRI、SmaI で切断した後、脱リン酸化処理を行った。

⑥④で作製した GADII 遺伝子と⑤で作製されたベクターとを、Ligation Pack (日本ジーン製) を用いてその取扱説明書に従い連結した。

なお、上記過程でのベクターに挿入された遺伝子の確認は、挿入断片の塩基配列を読み取って行った。

## (2) GADII 遺伝子の大量調整

GADII 遺伝子を組み込んだプラスミドを『Molecular Cloning Second Edition』(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) chapter 1 に記載の方法で大量調製した。

## 2. GADII の発現

(1) 大量調製したプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS に導入した。

(2) 該大腸菌をアンピシリン  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、クロラムフェニコール  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  を含む LB 培地で培養し、分光光度計 (ベックマン製) で濁度が  $600 \text{ nm}$  の波長で  $0.5$  になった時点で IPTG を  $0.5 \text{ mM}$  になるように加え、GADII の発現誘導を行った。この培養は、計  $4 \text{ L}$  行った ( $800 \text{ ml} \times 5$ )。

## 3. GADII の精製

(1) 2 時間後、遠心分離により大腸菌を回収し、Lysis Buffer ( $10 \text{ mM Tris-HCl}$  pH7.9,  $10\%$  Glycerol,  $0.5 \text{ M NaCl}$ ,  $0.1\%$  NP40,  $5 \text{ mM 2-Mercaptoethanol}$ ,  $1 \text{ mM PMSF}$ ) に懸濁した後  $4^\circ\text{C}$  でソニケーションし、

Beckman Optima XL-80を使用し、50.2Tiローターで1800rpm、4℃で15分間遠心分離した。

(2) その後、上清を取り、1Mイミダゾール(pH7.5)を終濃度10mMになるように加え、Ni-アガロース(登録商標、キアゲン製)を用いて非変性条件で取扱い説明書の通りに精製した。

(3) 精製された標品の一部を、2×SDSサンプルバッファーと等量ずつ混合し、3分間沸騰水中でボイルした後、10%SDS-PAGE電気泳動にかけ、クマシーブリリアントブルーで染色したところ、56kD付近にバンドが現れ、得られた蛋白質がGADII蛋白質であることが確認された。

(4) 次に残った精製GADII蛋白質を(3)と同様に2×SDSサンプルバッファーで処理し、5mmゲル厚の10%SDS-PAGE電気泳動にかけ、泳動終了後ゲルを4℃にて0.25MのKClで30分間染色を行った。

(5) 56kD付近の白く染色された目的のバンドをカッターナイフで切り出し、そのバンドをカッターナイフでさらに細かく刻んだ。

(6) バイオラッド社製のモデル422エレクトロエリ्यूターを用い、取扱い説明書に従い20mAで8時間、蛋白質の溶出を行った。

(7) 溶出された蛋白質を該エレクトロエリ्यूターの取扱説明書に従い回収した。蛋白質溶液の保存は-80℃にて行った。

上記の操作により得られた組み換え体GADII蛋白質を本発明の方法及びキットにおいて用いた。また、上記操作により得た組み換え体GADII蛋白質は、以下の抗GADII抗体の製造のためにも用いた。

#### (実施例5) 抗GADII抗体の作製

##### 1. 抗GADII抗体の作製

実施例4で作製したGADII蛋白質を『Antibodies A Laboratory Manual』(Cold Spring Harbor L

aboratory, 1988) chapter 5』に記載の方法にしたがってウサギに免疫し、抗GAD I I抗体を作製した。

## 2. ウェスタンブロット

『Current protocols in molecular biology』(Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987) chapter 1に記載の方法にしたがって行った。

(1) 実施例4で作製、精製したGAD I I蛋白質をナイロンメンブラン(イモビロンP(ミリポア製))上にウェスタンブロットを行った。

(2) その後、抗GAD I I抗体をメンブラン上のGAD I I蛋白質と反応させた。二次抗体としてアルカリフォスファターゼで標識された抗ウサギIgG抗体を反応させ、さらに該アルカリフォスファターゼを基質(NBT、BCID

(共にプロメガ製))と反応させ、呈色させた。結果を図6に示す。図中の数字は蛋白質の分子量を示し、単位はkDである。図中の矢印は、GAD I I蛋白質のバンドの位置を示す。その結果、56kDにGAD I I蛋白質のバンドが検出され、これより抗GAD I I抗体がGAD I I蛋白質と反応することが確認された。

同様に、実施例2のI Iで得たヒトGAD I I遺伝子から得られた組み換え体GAD I I蛋白質と本実施例の抗体を反応させたところ、本実施例の抗体はヒトGAD I I蛋白質とも交差反応することがわかった。

ここで得た抗GAD I I抗体は、実施例4で得たGAD I I蛋白質と共に、本発明の測定方法におけるサンドイッチELISAにおいて用いることができる。

## (実施例6) GAD I I蛋白質の肝癌の診断への利用の予備検討

(1) 実施例1で作製した肝癌組織(DEN投与後7ヶ月)及び正常肝臓組織をそれぞれ1gを5mlの2xSDS sample bufferでホモジナ

イズした後、3分間ボイルすることで肝癌組織抽出液及び正常肝臓組織抽出液を得た。

(2) 該抽出液、実施例4で作成したGAD I Iを12.5% SDS-PAGE電気泳動にかけた後、ウェスタンブロットを行った。なお、蛋白質量は、別に同様の電気泳動を行ったゲルをクマシーブリリアントブルーで染色したのち、比色することで揃えた。

(3) その後、実施例5で作製した抗GAD I I抗体を該抽出液と反応させた。二次抗体としてアルカリフォスファターゼで標識された抗ウサギIgG抗体を反応させ、さらに該アルカリフォスファターゼを基質(NBT、BCID(共にプロメガ製))と反応させ呈色させた。結果を図7に示す。図中の数字は蛋白質の分子量を示し、単位はkDである。図中の矢印は、GAD I I蛋白質のバンドの位置を示す。この結果、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法の結果と同様に、肝癌及び肝癌発症過程で有意なGAD I I蛋白質の増加が確認された。すなわち、肝癌の発症とGAD I I蛋白質の増加に相関関係があることが判明した。しかしながら、この方法では、生体より肝臓組織を採取しかつ組織より蛋白質を抽出しなければならない。

#### (実施例7) GAD I I遺伝子の組織間分布の確認

組織間分布の確認には、Rat MTN Blot™(クローンテック製)を用いた。この製品は、上述のノーザンブロットハイブリダイゼーションを行うために市販されている、ラット各組織のpolyA RNAをブロットしたメンブランである。このメンブランを『Molecular Cloning Second Edition』(Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989) pp7. 3-7. 84に記載の方法、及び製品取り扱い説明書に従い実施例3で得たGAD I I遺伝子プローブを用いてそれぞれノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。

結果を図5に示す。結果から明らかなように、GAD I I 遺伝子は肝臓、腎臓で強く発現していて、長さは異なるが肺でも発現していることが判った。このことより、腎臓癌や胃癌においてもGAD I I 遺伝子及びGAD I I 蛋白質の発現が増加するならばそれらを検出することにより腎臓癌や胃癌の発症のモニターも可能となる。

#### (実施例8) 抗GAD I I 抗体の検出—ウエスタンブロット法

以上の結果より、肝臓癌の発症に伴ってGAD I I 遺伝子及びGAD I I 蛋白質の発現が増加することが判った。そこで、本発明者らは、より簡便にGAD I I 蛋白質の発現をモニターできる方法を検討したところ、肝癌が発症したラットにおいてはGAD I I に対する抗体が産生されることを見だし、その抗体を測定することにより肝癌の発症をモニターできることを見いだした。以下、その測定方法を説明する。

『Current protocol in molecular biology』chapter 10に記載の方法に従ってウエスタンブロットを行うことで抗GAD I I 抗体の検出を行った。以下にその方法を示す。

(1) 実施例4で作製・精製した組み換え体GAD I I 蛋白質100mgを10% SDS-PAGEにて電気泳動後、日本エイドー社製のセミドライ転写装置(ボール型)を用い、イモビロンPメンブラン(ミリポア社製)に蛋白質の転写を行った。転写条件は、日本エイドー社の製品説明に記載の推奨される条件に従った。転写後、メンブランをTBS(20mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl)で洗浄し、次いで、TBST(20mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl、0.05% Tween20)に溶解した3%スキムミルク溶液(以下、単にスキムミルク溶液という)を用いて室温で1時間ブロッキングした。

(2) その後、正常ラットの血液を採取し常法により血清を調製した。その血清

を、3%のスキムミルク溶液を用いて後述の各種希釈倍率に希釈した。また、実施例1のI. 1. で採取した肝癌ラットの血清を、3%スキムミルクを用いて後述の各種希釈倍率に希釈した。それぞれの希釈液中に、組み換え体GAD I I蛋白質が転写されたメンブランを入れ、GAD I I蛋白質と室温にて1. 0時間反応させた。反応後、メンブランを3%スキムミルク溶液で、室温にて5分間、3回洗浄し、その後、二次抗体としてアルカリフォスファターゼで標識された抗ラットI g G抗体（プロメガ社より購入）を反応させた。反応条件（希釈倍率）は取扱説明書に従った。反応後メンブランを再びT B S Tで3回、そしてT B Sで2回洗浄し、次いで、アルカリフォスファターゼ基質であるN B T、B C I D（プロメガ製）をアルカリフォスファターゼ緩衝液（100mM T r i s - H C l pH9. 5、100mM N a C l、5mM M g C l<sub>2</sub>）10mlにそれぞれ66μl、33μl溶解した液中にメンブランを入れ、呈色反応を行った。結果を図1及び図2に示す。

図1 Aは、正常ラットの血清とDEN投与7カ月後の肝癌ラット（2例、H C C 1及びH C C 2）の血清を3%スキムミルク溶液で1000倍に希釈した液をそれぞれGAD I I蛋白質と反応させたウエスタンブロットの結果を示す写真である。H C C 1及びH C C 2は、それぞれの肝癌ラットの血清を反応させたレーンである。N o r m a lは正常ラットの血清を反応させたレーンである。矢印は、GAD I I蛋白質のバンドの位置を示し、数値は分子量を示す。この写真より、DEN投与7カ月後の肝癌ラットの血清のそれぞれから抗GAD I I抗体が検出されたことが認められた。

図1 Bは、正常ラットの血清を3%スキムミルク溶液により50倍及び100倍に希釈した試料、並びにDEN投与7カ月後の肝癌ラットの血清を3%スキムミルクで5000倍及び10000倍に希釈した試料のそれぞれをGAD I I蛋白質と反応させたウエスタンブロットの結果を表す写真である。H C Cは肝癌ラットの血清を反応させたレーンであり、N o r m a lは正常ラットの血清を反応

させたレーンである。数字は希釈倍率を示す。矢印は、GAD I I 蛋白質のバンドの位置を示す。この写真より、正常ラットからの血清では、50倍に希釈した試料でも抗GAD I I 抗体の検出は認められなかった。一方、DEN投与7カ月後の肝癌ラットからの血清では、10000倍に希釈した試料でも抗GAD I I 抗体の検出が認められた。

図1Cは、正常ラットの血清とDEN投与1、3、5及び7カ月経過後の肝癌ラットの血清を3%スキムミルクで1000倍に希釈した液をそれぞれGAD I I 蛋白質と反応させたウエスタンブロットの結果を示す写真である。HCCは、それぞれの肝癌ラットの血清を反応させたレーンであり、数字はDEN投与後の経過月数を示す。Normalは正常ラットの血清を反応させたレーンである。矢印は、GAD I I 蛋白質のバンドの位置を示す。この写真より、DEN投与後1カ月の肝癌ラットの血清のから抗GAD I I 抗体が検出されたことが認められた。

図2は、正常ラットの血清とDEN投与7カ月後の肝癌ラットの血清を3%スキムミルクで1000倍及び2000倍に希釈した試料をそれぞれGAD I I 蛋白質と反応させたウエスタンブロットの結果を示す写真である。100N及び200Nはそれぞれ正常ラットの血清を1000倍及び2000倍に希釈した試料を反応させたものであり、100T及び200Tはそれぞれ肝癌ラットの血清を1000倍及び2000倍に希釈した試料を反応させたものである。Pは、ポジティブコントロールとして、実施例5で調製した抗GAD I I 抗体ポリクローナル抗体を反応させたものである。矢印は、GAD I I 蛋白質のバンドの位置を示す。これらの写真より、DEN投与7カ月後の肝癌ラットの血清のそれぞれから抗GAD I I 抗体が検出されたことが認められた。

以上の結果より、肝癌を有するラットの血清からGAD I I 抗体と反応する抗GAD I I 抗体が顕著に検出され、一方、正常ラットの血清中の抗GAD I I 抗体は検出限界以下であることが判った。つまり、抗GAD I I 自己抗体が存在す

ること、しかも肝癌ラットの血清中に抗GAD I I 自己抗体が遊離して存在することが実際に示された。さらに、抗GAD I I 抗体が、肝癌ラットの血清中では正常ラットの血清中のに比べて明らかに多くの量で存在することが示された。このことは、組み換え体GAD I I 蛋白質を用いたウエスタンブロットにより、抗原抗体反応を利用して、肝癌ラットで発現している抗GAD I I 抗体を検出することにより、肝癌の発症をスクリーニングできることを示している。また、ラット以外の動物であっても、その動物型GAD I I 蛋白質（たとえば、ヒト型GAD I I 蛋白質）を用いてその動物の肝癌の診断の可能性を示唆している。既に記したように、本発明者らによりヒトにおいてもGAD I I 遺伝子は単離同定されており、ヒトにおいて抗GAD I I 抗体を検出することによりヒト肝癌の発症をモニターできる可能性は高い。

ウエスタンブロット法により、肝癌ラットの血清中に抗GAD I I 自己抗体が存在することが確認された。また、GAD I I がメンブレン膜に固定されることも確認された。これらより、GAD I I をプレートに固定し、抗原抗体反応を利用して抗GAD I I 自己抗体をELISA法で検出することが可能であるとわかった。ELISA法の操作は、例えば、以下の方法で行えばよい。

#### 抗GAD I I 抗体の検出—ELISA法

(1) 実施例4で作製・精製した組み換え体GAD I I 蛋白質をPBSに10  $\mu$ g/mlの濃度に溶解した溶液をマイクロタイタープレートの各ウェルに加え、固定した。その後、溶液を除去した。

(2) 正常ラットの血清及び肝癌ラットの血清を、3%スキムミルクで倍々希釈した試料を調製し、各ウェルに加え反応を行った。

(5) 二次抗体としてパーオキシダーゼで標識された抗ラットIgG抗体(CALTAG社より購入)を反応させた後、各ウェルをPBSで3回洗浄した。次いで、パーオキシダーゼ基質溶液(100mM citrate buffer



pH 4.0、0.006%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、0.3 mg/ml ABTS) を加え呈色反応を行い、1.5% シュウ酸溶液を加えて反応を停止した。その後、415 nm における吸光度を測定する。

また、本発明の方法は、実施例5で作製した抗血清より精製したウサギの抗GADI抗体を用いてサンドイッチELISA法でも可能である。

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：506

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列

Met	Ala	Asp	Ser	Lys	Pro	Leu	Arg	Thr	Leu	Asp	Gly	Asp	Pro	Val	Pro
1				5					10					15	
Val	Glu	Ala	Leu	Leu	Arg	Asp	Val	Phe	Gly	Ile	Val	Val	Asp	Glu	Ala
				20					25					30	
Ile	Arg	Lys	Gly	Thr	Asn	Ala	Ser	Glu	Lys	Val	Cys	Glu	Trp	Lys	Glu
				35					40					45	
Pro	Glu	Glu	Leu	Lys	Gln	Leu	Leu	Asp	Leu	Glu	Leu	Gln	Ser	Gln	Gly
				50					55					60	
Glu	Ser	Arg	Glu	Arg	Ile	Leu	Glu	Arg	Cys	Arg	Ala	Val	Ile	His	Tyr
				65					70					75	
Ser	Val	Lys	Thr	Gly	His	Pro	Arg	Phe	Phe	Asn	Gln	Leu	Phe	Ser	Gly
				85					90					95	
Leu	Asp	Pro	His	Ala	Leu	Ala	Gly	Arg	Ile	Ile	Thr	Glu	Ser	Leu	Asn
				100					105					110	
Thr	Ser	Gln	Tyr	Thr	Tyr	Glu	Ile	Ala	Pro	Val	Phe	Val	Leu	Met	Glu
				115					120					125	
Glu	Glu	Val	Leu	Lys	Lys	Leu	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Trp	Asn	Thr	Gly
				130					135					140	
Asp	Gly	Val	Phe	Cys	Pro	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Asn	Met	Tyr	Ala	Ile

145	150	155	160												
Asn	Leu	Ala	Arg	Phe	Gln	Arg	Tyr	Pro	Asp	Cys	Lys	Gln	Arg	Gly	Leu
	165		170		175										
Arg	Ala	Leu	Pro	Pro	Leu	Ala	Leu	Phe	Thr	Ser	Lys	Glu	Cys	His	Tyr
	180		185		190										
Ser	Ile	Thr	Lys	Gly	Ala	Ala	Phe	Leu	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Ser	Val
	195		200		205										
Arg	Val	Val	Lys	Ala	Asp	Glu	Arg	Gly	Lys	Met	Ile	Pro	Glu	Asp	Leu
	210		215		220										
Glu	Arg	Gln	Ile	Ser	Leu	Ala	Glu	Ala	Glu	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Leu
225		230		235		240									
Val	Ser	Ala	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Leu	Gly	Ala	Phe	Asp	Pro	Leu
	245		250		255										
Asp	Ala	Ile	Ala	Asp	Val	Cys	Gln	Arg	His	Gly	Leu	Trp	Leu	His	Val
	260		265		270										
Asp	Ala	Ala	Trp	Gly	Gly	Ser	Val	Leu	Leu	Ser	Arg	Thr	His	Arg	His
	275		280		285										
Leu	Leu	Asp	Gly	Ile	Gln	Arg	Ala	Asp	Ser	Val	Ala	Trp	Asn	Pro	His
	290		295		300										
Lys	Leu	Leu	Ala	Ala	Gly	Leu	Gln	Cys	Ser	Ala	Leu	Leu	Leu	Arg	Asp
305		310		315		320									
Thr	Ser	Asn	Leu	Leu	Lys	Arg	Cys	His	Gly	Ser	Gln	Ala	Ser	Tyr	Leu
	325		330		335										
Phe	Gln	Gln	Asp	Lys	Phe	Tyr	Asn	Val	Ala	Leu	Asp	Thr	Gly	Asp	Lys
	340		345		350										
Val	Val	Gln	Cys	Gly	Arg	Arg	Val	Asp	Cys	Leu	Lys	Leu	Trp	Leu	Met

355	360	365	
Trp Lys Ala Gln Gly Gly Gln Gly Leu Glu Trp Arg Ile Asp Gln Ala			
370	375	380	
Phe Ala Leu Thr Arg Tyr Leu Val Glu Glu Ile Lys Lys Arg Glu Gly			
385	390	395	400
Phe Glu Leu Val Met Glu Pro Glu Phe Val Asn Val Cys Phe Trp Phe			
405	410	415	
Val Pro Pro Ser Leu Arg Gly Lys Lys Glu Ser Pro Asp Tyr Ser Gln			
420	425	430	
Arg Leu Ser Gln Val Ala Pro Val Leu Lys Glu Arg Met Val Lys Lys			
435	440	445	
Gly Thr Met Met Ile Gly Tyr Gln Pro His Gly Thr Arg Ala Asn Phe			
450	455	460	
Phe Arg Met Val Val Ala Asn Pro Ile Leu Val Gln Ala Asp Ile Asp			
465	470	475	480
Phe Leu Leu Gly Glu Ala Gly Ala Ser Gly Pro Gly Pro Val Ser Cys			
485	490	495	
Phe Leu Ser Leu Pro His Pro Ser Ser Ala			
500	505		

配列番号： 2

配列の長さ： 2 1 2 1

配列の型： 核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： cDNA    t o    mRNA

## 配列

CGCGCTCTGA ACCCGTCGTC TGAACCTCT CTGAACCTTC CTGAAGCTGG AAGATTTCAC	60
CCTG ATG GCT GAC TCA AAA CCA CTC AGA ACC CTG GAT GGG GAC CCT GTG	109
CCT GTG GAG GCT TTG CTC CGG GAC GTG TTT GGG ATT GTC GTA GAT GAG	157
GCC ATT CGG AAG GGG ACC AAT GCC TCT GAG AAG GTC TGC GAA TGG AAG	205
GAG CCT GAA GAG CTC AAG CAG CTG CTG GAC TTG GAG CTG CAG AGC CAG	253
GGC GAG TCT AGG GAG CGG ATC CTG GAG CGC TGC CGG GCT GTG ATT CAT	301
TAC AGT GTC AAG ACT GGT CAC CCC CGG TTC TTC AAC CAG CTC TTC TCA	349
GGA TTA GAT CCC CAT GCT CTG GCC GGG CGC ATC ATT ACG GAG AGC CTC	397
AAT ACC AGC CAG TAC ACA TAT GAG ATT GCC CCC GTG TTT GTG CTC ATG	445
GAA GAG GAG GTG CTG AAG AAA CTC CGT GCC CTT GTG GGC TGG AAC ACT	493
GGG GAT GGG GTC TTC TGT CCT GGT GGT TCC ATC TCT AAC ATG TAC GCC	541
ATA AAC CTG GCC CGC TTT CAG CGC TAC CCA GAC TGC AAG CAG AGG GGC	589
CTC CGG GCC CTG CCA CCC TTG GCC CTC TTC ACT TCA AAG GAG TGC CAC	637
TAC TCC ATC ACC AAG GGA GCT GCT TTT CTG GGA CTT GGC ACC GAC AGT	685
GTC CGA GTG GTC AAG GCT GAT GAG AGA GGG AAG ATG ATC CCT GAG GAT	733
CTG GAG AGG CAG ATC AGT CTG GCA GAG GCT GAG GGC TCG GTG CCA TTT	781
CTG GTC AGT GCC ACC TCT GGT ACC ACC GTG CTA GGG GCC TTT GAC CCC	829
CTG GAT GCA ATT GCC GAT GTT TGC CAG CGT CAC GGG CTG TGG TTA CAC	877
GTG GAT GCC GCC TGG GGT GGG AGC GTC CTG CTG TCC CGG ACA CAC AGG	925
CAT CTC CTG GAT GGG ATC CAG AGG GCT GAC TCC GTG GCC TGG AAC CCT	973
CAC AAG CTT CTC GCC GCG GGG CTG CAG TGC TCT GCT CTT CTT CTC CGG	1021
GAC ACC TCG AAC CTG CTC AAG CGC TGC CAC GGG TCC CAG GCC AGC TAC	1069
CTC TTC CAG CAA GAC AAG TTC TAC AAC GTG GCT CTG GAC ACC GGA GAC	1117
AAG GTG GTG CAG TGT GGC CGC CGC GTG GAC TGT CTG AAG CTG TGG CTC	1165
ATG TGG AAG GCG CAG GGT GGG CAA GGG CTG GAG TGG CGC ATC GAC CAG	1213

GCC TTT GCT CTC ACT CGG TAC TTG GTG GAG GAG ATA AAA AAG CGG GAA 1261  
 GGA TTT GAG TTG GTC ATG GAG CCC GAG TTC GTC AAC GTG TGC TTC TGG 1309  
 TTT GTG CCT CCC AGC CTG CGG GGG AAG AAG GAG AGC CCA GAT TAC AGC 1357  
 CAG AGG CTG TCT CAG GTG GCC CCT GTG CTC AAG GAG CGC ATG GTG AAG 1405  
 AAG GGA ACC ATG ATG ATC GGC TAC CAG CCC CAT GGG ACC CGG GCC AAC 1453  
 TTC TTC CGA ATG GTG GTG GCC AAC CCC ATA CTG GTC CAG GCC GAT ATA 1501  
 GAC TTC CTT CTG GGC GAG GCT GGA GCG TCT GGG CCA GGA CCT GTG AGC 1549  
 TGC TTC CTC TCT CTG CCC CAC CCA AGC TCT GCA TAA GCTCCTG GGTTCCTG 1602  
 AGCGACCTTT CTAGGAAACA GTGGCCTTGA CTGTGTGAGC CCCCACACAC TAACTCTCCT 1662  
 AGCTAAGTAT TGGCTGCCAG ACGGTGTCTA AGCACACTAC AGTCTGTTCT TACGAAATGT 1722  
 GCTTCTTTTA AGTCGGTCAT AGTGGTACAC ACCGTTAATA CCAGCACTGG GGAGGCAGAG 1782  
 GCAGACACAA GCAGATCTCT TGAGTTTGAG GCCAGCCTGG TCTACAGAGC TGGCCTACAC 1842  
 AGAAAAAAAA CCTGTCTCAA AAAAAAAGAA AGGAAGGAAG AAAGAAAGGA AAAGAAAGAA 1902  
 ATATTTTTCA TTAAGATTAT GTCTATAAAA AATTGTTATT AATATGAGAG ATATGGTACG 1962  
 ATGTATTAAG AAAGCTAGAT ATGGGGGTTG GGGATTTAGC TCAGTGGTAG AGCCCTTGCC 2022  
 TAGGAAGCGC AAGGCCCTGG GTTCGGTCCC CAGCTTCGAA AAAAAGGAAC CACAAAAAAA 2082  
 ACGGCCCGCT CTAGAACTAG TGGATCCCCC GGCCTGCAG 2121

配列番号： 3

配列の長さ： 4 9 3

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列

Met Ala Asp Ser Glu Ala Leu Pro Ser Leu Ala Gly Asp Pro Val Ala

1

5

10

15

Val Glu Ala Leu Leu Arg Ala Val Phe Gly Val Val Val Asp Glu Ala  
20 25 30  
Ile Gln Lys Gly Thr Ser Val Ser Gln Lys Val Cys Glu Trp Lys Glu  
35 40 45  
Pro Glu Glu Leu Lys Gln Leu Leu Asp Leu Glu Leu Arg Ser Gln Gly  
50 55 60  
Glu Ser Gln Lys Gln Ile Leu Glu Arg Cys Arg Ala Val Ile Arg Tyr  
65 70 75 80  
Ser Val Lys Thr Gly His Pro Arg Phe Phe Asn Gln Leu Phe Ser Gly  
85 90 95  
Leu Asp Pro His Ala Leu Ala Gly Arg Ile Ile Thr Glu Ser Leu Asn  
100 105 110  
Thr Ser Gln Tyr Thr Tyr Glu Ile Ala Pro Val Phe Val Leu Met Glu  
115 120 125  
Glu Glu Val Leu Arg Lys Leu Arg Ala Leu Val Gly Trp Ser Ser Gly  
130 135 140  
Asp Gly Ile Phe Cys Pro Gly Gly Ser Ile Ser Asn Met Tyr Ala Val  
145 150 155 160  
Asn Leu Ala Arg Tyr Gln Arg Tyr Pro Asp Cys Lys Gln Arg Gly Leu  
165 170 175  
Arg Thr Leu Pro Pro Leu Ala Leu Phe Thr Ser Lys Glu Cys His Tyr  
180 185 190  
Ser Ile Gln Lys Gly Ala Ala Phe Leu Gly Leu Gly Thr Asp Ser Val  
195 200 205  
Arg Val Val Lys Ala Asp Glu Arg Gly Lys Met Val Pro Glu Asp Leu  
210 215 220

Glu Arg Gln Ile Gly Met Ala Glu Ala Glu Gly Ala Val Pro Phe Leu  
 225                      230                      235                      240  
 Val Ser Ala Thr Ser Gly Thr Thr Val Leu Gly Ala Phe Asp Pro Leu  
                          245                      250                      255  
 Glu Ala Ile Ala Asp Val Cys Gln Arg His Gly Leu Trp Leu His Val  
                          260                      265                      270  
 Asp Ala Ala Trp Gly Gly Ser Val Leu Leu Ser Gln Thr His Arg His  
                          275                      280                      285  
 Leu Leu Asp Gly Ile Gln Arg Ala Asp Ser Val Ala Trp Asn Pro His  
                          290                      295                      300  
 Lys Leu Leu Ala Ala Gly Leu Gln Cys Ser Ala Leu Leu Leu Gln Asp  
 305                      310                      315                      320  
 Thr Ser Asn Leu Leu Lys Arg Cys His Gly Ser Gln Ala Ser Tyr Leu  
                          325                      330                      335  
 Phe Gln Gln Asp Lys Phe Tyr Asp Val Ala Leu Asp Thr Gly Asp Lys  
                          340                      345                      350  
 Val Val Gln Cys Gly Arg Arg Val Asp Cys Leu Lys Leu Trp Leu Met  
                          355                      360                      365  
 Trp Lys Ala Gln Gly Asp Gln Gly Leu Glu Arg Arg Ile Asp Gln Ala  
                          370                      375                      380  
 Phe Val Leu Ala Arg Tyr Leu Val Glu Glu Met Lys Lys Arg Glu Gly  
 385                      390                      395                      400  
 Phe Glu Leu Val Met Glu Pro Glu Phe Val Asn Val Cys Phe Trp Phe  
                          405                      410                      415  
 Val Pro Pro Ser Leu Arg Gly Lys Gln Glu Ser Pro Asp Tyr His Glu  
                          420                      425                      430



Arg Leu Ser Lys Val Ala Pro Val Leu Lys Glu Arg Met Val Lys Glu  
 435 440 445  
 Gly Ser Met Met Ile Gly Tyr Gln Pro His Gly Thr Arg Gly Asn Phe  
 450 455 460  
 Phe Arg Val Val Val Ala Asn Ser Ala Leu Thr Cys Ala Asp Met Asp  
 465 470 475 480  
 Phe Leu Leu Asn Glu Leu Glu Arg Leu Gly Gln Asp Leu  
 485 490

配列番号： 4

配列の長さ： 1 9 2 6

配列の型： 核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： cDNA t o mRNA

配列

CGGCGCGCCT GTAATCCCAG CACTCTGGGA GACCGAGATT CTTGGTTGAT GCAAATCAAA	60
TAGAGATCCT G ATG GCT GAC TCA GAA GCA CTC CCC TCC CTT GCT GGG GAC	110
CCA GTG GCT GTG GAA GCC TTG CTC CGG GCC GTG TTT GGG GTT GTT GTG	158
GAT GAG GCC ATT CAG AAA GGA ACC AGT GTC TCC CAG AAG GTC TGT GAG	206
TGG AAG GAG CCT GAG GAG CTG AAG CAG CTG CTG GAT TTG GAG CTG CGG	254
AGC CAG GGC GAG TCA CAG AAG CAG ATC CTG GAG CGG TGT CGG GCT GTG	302
ATT CGC TAC AGT GTC AAG ACT GGT CAC CCT CGG TTC TTC AAC CAG CTC	350
TTC TCT GGG TTG GAT CCC CAT GCT CTG GCC GGG CGC ATT ATC ACT GAG	398
AGC CTC AAC ACC AGC CAG TAC ACA TAT GAA ATC GCC CCC GTG TTT GTG	446
CTC ATG GAA GAG GAG GTG CTG AGG AAA CTG CGG GCC CTG GTG GGC TGG	494

AGC TCT GGG GAC GGA ATC TTC TGC CCT GGT GGC TCC ATC TCC AAC ATG	542
TAT GCT GTA AAT CTG GCC CGC TAT CAG CGC TAC CCG GAT TGC AAG CAG	590
AGG GGC CTC CGC ACA CTG CCG CCC CTG GCC CTA TTC ACA TCG AAG GAG	638
TGT CAC TAC TCC ATC CAG AAG GGA GCT GCG TTT CTG GGA CTT GGC ACC	686
GAC AGT GTC CGA GTG GTC AAG GCT GAT GAG AGA GGG AAA ATG GTC CCC	734
GAG GAT CTG GAG AGG CAG ATT GGT ATG GCC GAG GCT GAG GGT GCT GTG	782
CCG TTC CTG GTC AGT GCC ACC TCT GGC ACC ACT GTG CTA GGG GCC TTT	830
GAC CCC CTG GAG GCA ATT GCT GAT GTG TGC CAG CGT CAT GGG CTA TGG	878
CTG CAT GTG GAT GCT GCC TGG GGT GGG AGC GTC CTG CTG TCA CAG ACA	926
CAC AGG CAT CTC CTG GAT GGG ATC CAG AGG GCT GAC TCT GTG GCC TGG	974
AAT CCC CAC AAG CTC CTC GCA GCA GGC CTG CAA TGC TCT GCA CTT CTT	1022
CTC CAG GAT ACC TCG AAC CTG CTC AAG CGC TGC CAT GGG TCC CAG GCC	1070
AGC TAC CTT TTC CAG CAG GAC AAG TTC TAC GAT GTG GCT CTG GAC ACG	1118
GGA GAC AAG GTG GTG CAG TGT GGC CGC CGT GTG GAC TGT CTG AAG CTG	1166
TGG CTC ATG TGG AAG GCA CAG GGC GAT CAA GGG CTG GAG CGG CGC ATC	1214
GAC CAG GCC TTT GTC CTT GCC CGG TAC CTG GTG GAG GAA ATG AAG AAG	1262
CGG GAA GGG TTT GAG CTA GTC ATG GAG CCT GAG TTT GTC AAT GTG TGT	1310
TTC TGG TTC GTA CCC CCC AGC CTG CGA GGG AAG CAG GAG AGT CCA GAT	1358
TAC CAC GAA AGG CTG TCA AAG GTG GCC CCC GTG CTC AAG GAG CGC ATG	1406
GTG AAG GAG GGC TCC ATG ATG ATT GGC TAC CAG CCC CAC GGG ACC CGG	1454
GGC AAC TTC TTC CGT GTG GTT GTG GCC AAC TCT GCA CTG ACC TGT GCT	1502
GAT ATG GAC TTC CTC CTC AAC GAG CTG GAG CGG CTA GGC CAG GAC CTG	1550
TGA GCCTTCTCTG TCTTGCTGCC GGCCTTGATA CCACCCCTCA CCCGCAGAGT	1603
CACTGCATTG CCTCCCAGCC TTTGAGGCCG GGTGCAGTGG CTCACGCCTG TAATCCCAGC	1663
ACTTTGGGAG GCCGAGGCCG GTGGATCACT TGAGGTCAGG AGTTCGAGAC CAGCCTGGCC	1723
AATAAGGTGA AACCTGTCT CTAATAAAAA TACAAAAATT AGCCGAGCAT GGTGGCCTGT	1783

GCCTGTAAAC CCAGCTACTC AGGAGGTTGG GGCAGAATTG CTTGAACCCA GGGGGCAGAG 1843  
GTTGCAGTGA GCCGAGATTG CACCCCTGCA CTCCAGGCTG GGCAACAGTA CGAGACTCTG 1903  
TTCCAAAAAA AATAAAAAAG CCG 1926

## 請求の範囲

1. 抗GAD I I抗体を含む生体由来試料をGAD I I蛋白質と反応させGAD I I蛋白質-抗GAD I I抗体複合体を形成する工程、及び  
該GAD I I蛋白質-抗GAD I I抗体複合体を検出する工程を含むことを特徴とする試料中の抗GAD I I抗体の検出方法。

2. 前記抗GAD I I抗体を含む生体由来試料が、血清であることを特徴とする請求項1に記載の検出方法。

3. 更に、抗GAD I I抗体を含む試料をGAD I I蛋白質と反応させる前に、GAD I I蛋白質を固体支持体に固定する工程を含む請求項1又は2に記載の抗GAD I I抗体の検出方法。

4. 前記固体支持体が、メンブラン又はマイクロタイタープレートであることを特徴とする請求項3に記載の検出方法。

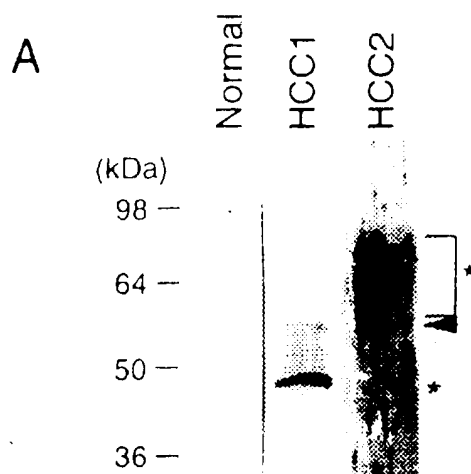
5. 更に、形成された前記GAD I I蛋白質-抗GAD I I抗体複合体を分離する工程を含む請求項1又は2に記載の抗GAD I I抗体の検出方法。

6. 前記GAD I I蛋白質-抗GAD I I抗体複合体を検出する工程が、標識された抗Ig抗体を用いることを特徴とする請求項1～5のいずれか一つに記載の検出方法。

7. 前記GAD I I蛋白質が組み換え体GAD I I蛋白質であることを特徴とする請求項1～6のいずれか一つに記載の検出方法。

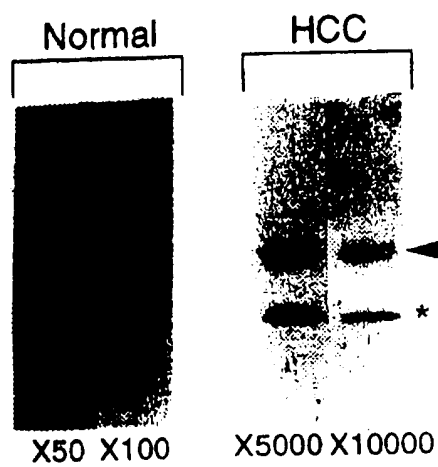
8. 前記請求項 1 ～ 7 のいずれか一つの検出方法を含む癌の診断方法。
9. 前記癌が肝癌である、請求項 8 に記載の診断方法。
10. GAD II 蛋白質を含む試薬を含む抗 GAD II 抗体を検出するためのキット。
11. GAD II 蛋白質を含む試薬 A 及び標識された抗 Ig 抗体を含む試薬 B を含む抗 GAD II 抗体を検出するためのキット。
12. 前記 GAD II 蛋白質が組み換え体 GAD II 蛋白質であることを特徴とする請求項 10 又は 11 に記載の検出キット
13. GAD II 蛋白質を含む試薬を含む癌の診断キット。
14. GAD II 蛋白質を含む試薬 A 及び標識された抗 Ig 抗体を含む試薬 B を含む癌の診断キット。
15. 前記 GAD II 蛋白質が組み換え体 GAD II 蛋白質であることを特徴とする請求項 14 又は 15 に記載の検出キット。


FIG 1 A



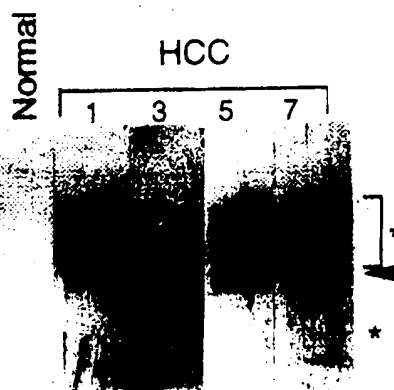
1 B

B

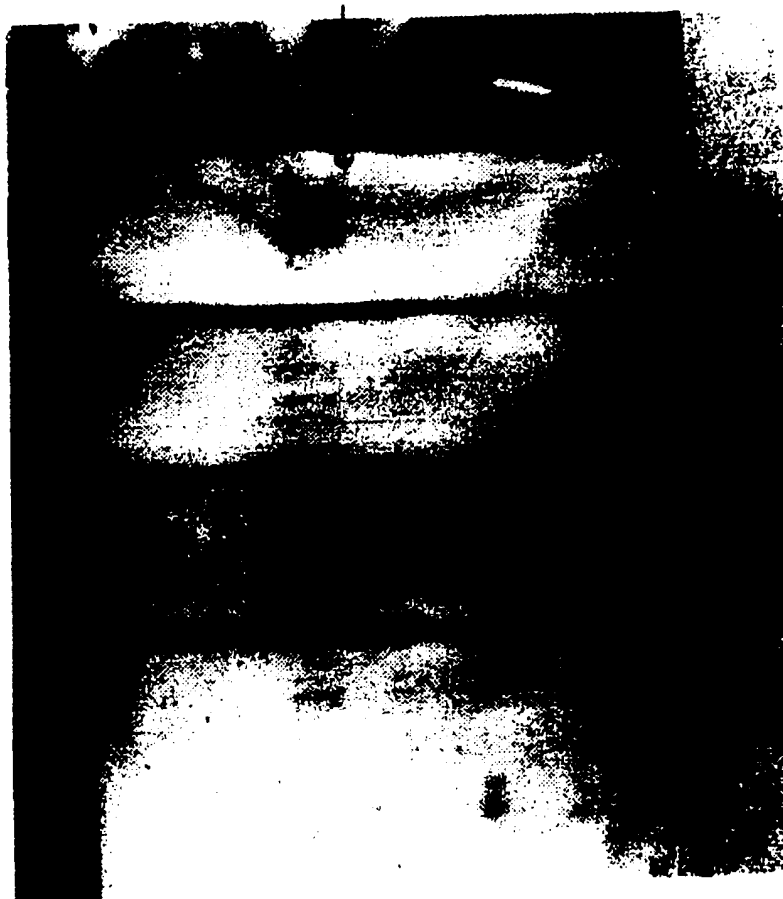


 1 C

e

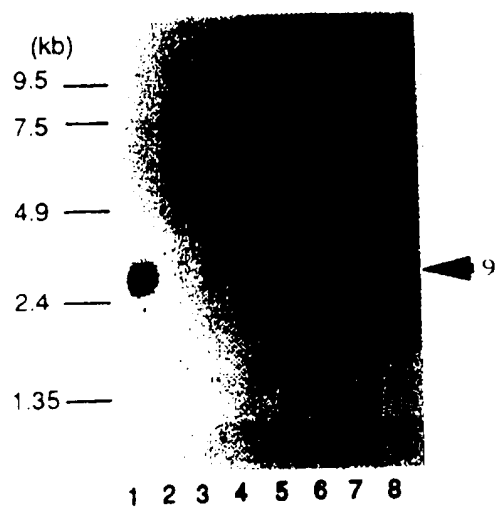




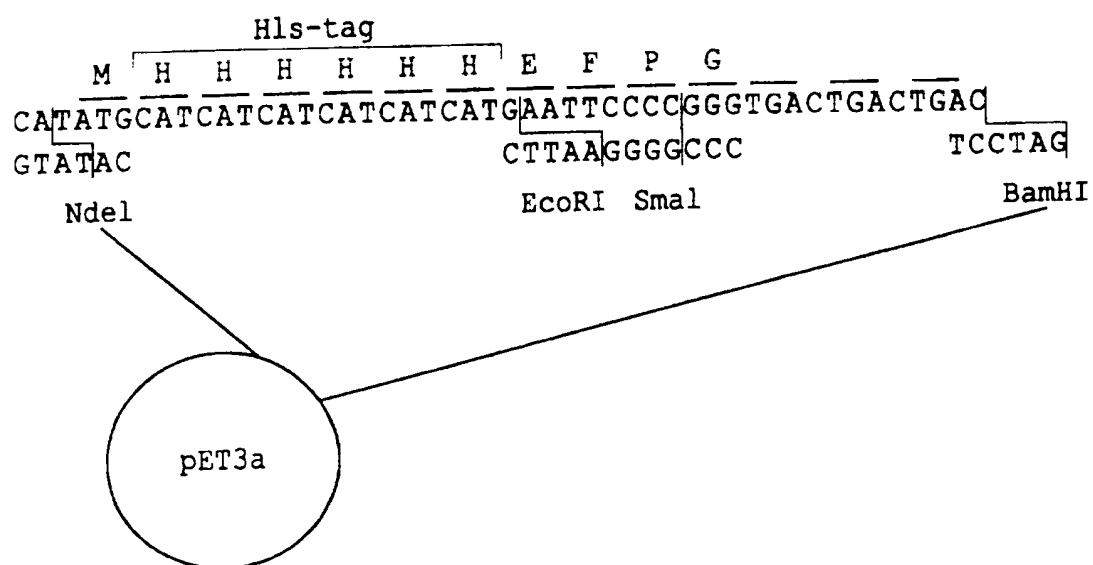


2

**3**

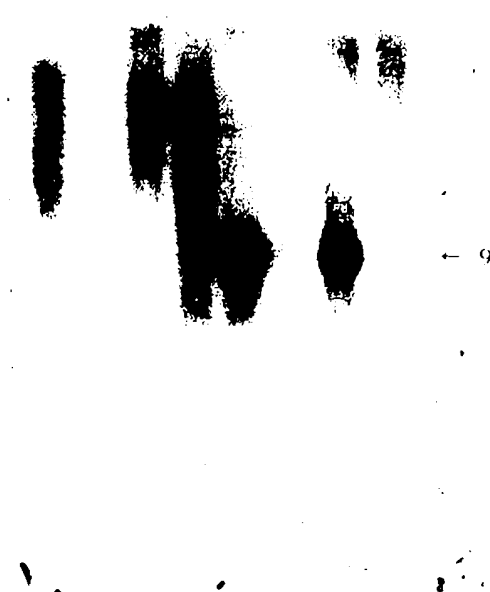


4

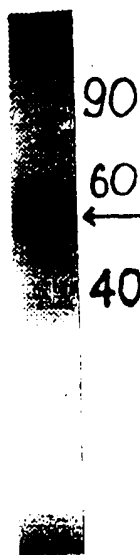


5

1 2 3 4 5 6 7 8



ⓧ 6



 7



90

60

40

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00174

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> G01N33/574, 33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> G01N33/574, 33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1940 - 1997
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971 - 1997
Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994 - 1997

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PROCEEDING OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE OF THE UNITED STATE OF AMERICA, VOL. 88, (1991), B.K. MICHELSEN, ET AL. "CLONING, CHARACTERIZATION, AND AUTOIMMUNE RECOGNITION OF RAT ISLET GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE IN INSULIN-DEPENDENT DD DIABETES MELLITUS", p. 8754-8758	1-7, 10-15
A	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, VOL. 1262, (1995), P.J. KAISAKIA, ET AL. "CLONING AND CHARACTERIZATION OF RAT CYSTEINE SULFINIC ACID DECARBOXYLASE", p. 79-82	1-7, 10-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

May 15, 1997 (15. 05. 97)

Date of mailing of the international search report

May 27, 1997 (27. 05. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00174

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8, 9  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 8 and 9 pertain to diagnostic methods.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl.<sup>8</sup> G 01 N 33/574, 33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl.<sup>8</sup> G 01 N 33/574, 33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1940-1997年  
日本国公開実用新案公報 1971-1997年  
日本国登録実用新案公報 1994-1997年

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	PROCEEDING OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE OF THE UNITED STATE OF AMERICA, VOL. 88, (1991), B. K. WICHENSEN. ET AL "CLONING, CHARACTERIZATION, AND AUTOIMMUNE RECOGNITION OF RAT ISLET GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE IN INSULIN-DEPENDENT DD DIABETES MELLITUS", p. 8754-8758	1-7, 10-15
A	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, VOL. 1262, (1995), P. J. KAISAKIA. ET AL "CLONING AND CHARACTERIZATION OF RAT CYSTEINE SULFINIC ACID DECARBOXYLASE" p. 79-82	1-7, 10-15

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
15.05.97

国際調査報告の発送日 27.05.97

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
亀田 宏之

印

2 J 9015

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの1の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8、9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、

診断方法である。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの2の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。